

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 19220051301759

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 畢 業 論 文

产木聚糖酶菌株的筛选、鉴定及  
木聚糖酶的分离纯化

Screening and identification of a xylanase-producing  
strain and purification of the xylanase

陈和秀

指导教师姓名: 徐方成 副教授

专 业 名 称: 化学工程

论文提交日期: 2008年5月

论文答辩时间: 2008年6月

学位授予日期: 2008年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2008 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。  
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ( ) , 在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ( )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

## 摘 要

我国生物质资源丰富,通过生物转化法将生物质转化为能源,既清洁又环保,可部分替代化石能源,减少温室气体排放。生物质能源化主要包括生物质分解和生物质转化两个关键步骤。在生物质分解阶段,如何提高半纤维素分解效率是关键,选育高效分解半纤维素的菌株对生物质开发利用有重要意义。

本试验先以自制蔗渣半纤维素为唯一碳源,从垃圾场土壤样品中分离到 6 株分解半纤维素的菌株,通过比较固态发酵产木聚糖酶活力,确定 1 株木聚糖酶活力较高的菌株。然后,以该菌株为研究对象,对该菌株的孢子和菌丝进行显微形态观察,发现其形态具有曲霉 (*Aspergillus sp.*) 特性。对该菌株 18S rDNA 序列进行分析,结果显示该菌株 18S rDNA 序列与曲霉的同源性达 97%。根据菌株形态学分析和 18S rDNA 序列分析的结果,将该菌株鉴定为曲霉,并命名为曲霉 (*Aspergillus sp.*) HQ3。

通过对该菌株的固态发酵产酶条件研究,初步确定曲霉 HQ3 的最佳产酶条件为:甘蔗渣:麸皮为 7:3 (W/W),固液比为 1:4 (W/W),尿素 0.4 %, pH7.0, 温度 30 °C,发酵产酶时间 4 d。在最佳产酶条件下,其木聚糖酶活最高可达 3421 U/g 干曲。

为构建高产木聚糖酶的工程菌株,本试验对 *Aspergillus sp.* HQ3 产的木聚糖酶进行分离纯化并对其酶学性质进行研究。粗酶液经硫酸铵沉淀、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) 疏水层析、Sephadex S-200 凝胶层析分离纯化后,得到一个木聚糖酶组分,该酶的最终收率为 1%,纯化倍数为 5.7。通过 SDS-PAGE 确定其分子量为 33 kD 左右。酶学研究表明该木聚糖酶的最适作用 pH4.8,最适作用温度 50 °C。

**关键词:** 曲霉; 木聚糖酶; 纯化

## Abstract

Biomass is abundance in our country. Transforming biomass into energy through biological way is clean and renewable which can substitute part of fossil energy and reduce the releasing of the green house gas. The transformation of biomass energy is mainly composed of the two crucial steps which are biomass decomposition and biomass transformation. In the decomposing stage how to improve the decomposing efficiency of hemicellulose is the key point, thus screening and cultivation of high efficient strains is of great importance for the exploitation and utilization of hemicellulose.

Six hemicellulose-decomposing strains were isolated from the refuse soil samples using bagasse hemicellulose as the sole carbon. The strain with high xylanase activity was observed through contrasting xylanase from solid-ferment bagasse. The micro-morphology of mycelia and spores of the strain were observed. The results showed that its morphological characteristics possessed of that of *Aspergillus* sp. The result of analysis of 18S rDNA sequences of the strain showed 97% similarity to *Aspergillus* sp. The strain was identified as *Aspergillus* sp. HQ3 by the result of analysis of 18S rDNA sequences and phenotypic properties.

The optimum solid-state fermentation conditions for xylanase production were obtained as: bagasse: bran=7: 3 (W/W), solid: liquid=1:4 (W/W), urea 0.4%, pH 7.0, fermentation temperature 30 °C, fermentation time 4 d. The activity of xylanase reached 3421 U/g koji under the optimum conditions.

For obtaining the high xylanase-producing strain, this study focuses on the purification of the xylanase and analysis of the enzymology character of the xylanase from *Aspergillus* sp. HQ3. The (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> was added to the culture filtrate, and the precipitated material was collected by centrifugation. The xylanase was purified by Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) chromatography and Sephadex S-200 chromatography. Its recovery rate and purification fold were respectively 1% and 5.7. SDS-PAGE showed that molecular weight of the xylanase was 33 kD. The result of

enzymology character analysis was that the optimal pH was 4.8 and the optimal temperature was 50 °C.

**Key words:** *Aspergillus* sp.; xylanase; purification

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目 录

<b>1 前 言</b>	<b>1</b>
<b>1.1 半纤维素</b>	<b>1</b>
1.1.1 半纤维素的组成	2
1.1.2 木聚糖的结构	2
1.1.3 木聚糖的提取	4
<b>1.2 木聚糖酶</b>	<b>6</b>
1.2.1 木聚糖酶的来源	6
1.2.2 木聚糖酶的组成及性质	7
1.2.3 木聚糖酶的合成	8
1.2.4 木聚糖酶的应用	9
1.2.5 木聚糖酶的研究趋势	10
<b>1.3 产木聚糖酶菌株的筛选及鉴定</b>	<b>11</b>
1.3.1 产木聚糖酶的微生物	11
1.3.2 筛选产木聚糖酶的菌株	11
1.3.3 产木聚糖酶菌株鉴定	11
<b>1.4 木聚糖酶的纯化与酶学性质</b>	<b>12</b>
1.4.1 木聚糖酶的纯化	12
1.4.2 木聚糖酶的酶学性质	13
<b>1.5 我国木聚糖酶的研究现状</b>	<b>14</b>
<b>1.6 本论文研究的内容</b>	<b>14</b>
<b>2 材 料 与 方 法</b>	<b>16</b>
<b>2.1 实验材料</b>	<b>16</b>
2.1.1 菌种及引物	16
2.1.2 实验底物	16
2.1.3 主要试剂	16
2.1.4 培养基	16
2.1.5 溶液配制	17

2.1.6 主要仪器.....	19
<b>2.2 实验方法 .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 半纤维素的提取 .....	19
2.2.2 产木聚糖酶的菌种筛选 .....	20
2.2.3 产木聚糖酶的菌种鉴定 .....	20
2.2.4 木聚糖酶的活力检测 .....	21
2.2.5 菌株产酶条件优化 .....	23
2.2.6 蛋白质含量的测定 .....	23
2.2.7 蛋白质电泳分析 .....	24
2.2.8 木聚糖酶的分离纯化 .....	26
2.2.9 木聚糖酶的一般理化性质 .....	27
<b>3 结果与分析 .....</b>	<b>28</b>
3.1 产木聚糖酶的菌种筛选 .....	28
3.2 产木聚糖酶的菌种鉴定 .....	28
3.3 菌株产酶条件优化 .....	30
3.3.1 麸皮含量对酶活力的影响 .....	30
3.3.2 氮源对产酶的影响 .....	30
3.3.3 固液比对酶活力的影响 .....	31
3.3.4 发酵温度对酶活力影响 .....	32
3.3.5 pH 对酶活力的影响.....	33
3.3.6 发酵时间对酶活力的影响 .....	33
3.3.7 曲霉 HQ3 最佳培养条件的确定 .....	34
<b>3.4 木聚糖酶的分离纯化 .....</b>	<b>35</b>
3.4.1 粗酶液制备及成分分析 .....	35
3.4.2 硫酸铵沉淀 .....	36
3.4.3 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) 疏水柱层析 .....	36
3.4.4 Sephadex S-200 分子筛层析 .....	37
<b>3.5 木聚糖酶的一般理化性质 .....</b>	<b>39</b>
3.5.1 pH 对木聚糖酶的影响.....	39



3.5.2 温度对木聚糖酶的影响 .....	40
<b>4 讨 论 .....</b>	<b>41</b>
4.1 产木聚糖酶的菌种筛选及鉴定 .....	41
4.2 菌株发酵条件优化 .....	42
4.3 木聚糖酶的分离纯化 .....	43
<b>总 结 与 展 望 .....</b>	<b>46</b>
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>47</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>52</b>

# Catalogue

<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Helicellulose</b>	<b>1</b>
1.1.1 Components of helicellulose	2
1.1.2 Structure of hemicellulose	2
1.1.3 Extracting xylan	4
<b>1.2 Xylanase</b>	<b>6</b>
1.2.1 Sources of xylanase	6
1.2.2 Components and properties of xylanase	7
1.2.3 Synthesized of xylanase	8
1.2.4 Utilizing xylanase	9
1.2.5 Research trend of xylanase	10
<b>1.3 Xylanase-producing strains</b>	<b>11</b>
1.3.1 Strains of xylanase-producing	11
1.3.2 Screening strains of xylanase-producing	11
1.3.3 Identifying of strains of xylanase-producing	11
<b>1.4 Purification xylanase and enzymology properties of xylanase</b>	<b>12</b>
1.4.1 Purification xylanase	12
1.4.2 Enzymology properties of xylanase	13
<b>1.5 Current situation of xylanase</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Content of the research</b>	<b>14</b>
<b>2 Material and methods</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>16</b>
2.1.1 Strain and primers	16
2.1.2 Experiment substrate	16
2.1.3 Reagents	16
2.1.4 Media	16
2.1.5 Solutions	17
2.1.6 Apparatus	19

<b>2.2 Methods</b>	<b>19</b>
2.2.1 Extracting hemicellulose	19
2.2.2 Screening strains of xylanase-producing	20
2.2.3 Identifying strains of xylanase-producing	20
2.2.4 Determining xylanase activity	21
2.2.5 Condition optimization of the xylanase-producing strain	23
2.2.6 Determining content of protein	23
2.2.7 Protein electrophoresis	24
2.2.8 Protein purification	26
2.2.9 Properties of xylanase	27
<b>3 Results and analysis</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Screening strains of xylanase-producing</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Identifying strains of xylanase-producing</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Condition optimization of a xylanase-producing strain</b>	<b>30</b>
3.3.1 Effect of bran content on xylanase activity	30
3.3.2 Effect of nitrogen source on xylanase activity	30
3.3.3 Effect of moisture content on xylanase activity	31
3.3.4 Effect of fermentation temperature on xylanase activity	32
3.3.5 Effect of fermentation pH on xylanase activity	33
3.3.6 Effect of fermentation time on xylanase activity	33
3.3.7 Determining the optimum conditions of <i>Aspergillus</i> sp. HQ3	34
<b>3.4 Protein purification</b>	<b>35</b>
3.4.1 (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> precipitated	35
3.4.2 Electrophoresis analysis of crude enzyme	36
3.4.3 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) chromatography	36
3.4.4 Sephadex S-200 chromatography	37
<b>3.5 Properties of xylanase</b>	<b>39</b>
3.5.1 Analysis of optimal reaction pH for xylanase	39
3.5.2 Analysis of optimal reaction temperature for xylanase	40

4 Conclusion and discussion-----	41
4.1 Screening and identifying strains of xylanase-production-----	41
4.2 Condition optimization of the xylanase-producing strain-----	42
4.3 Protein purification-----	43
Summarization and prospect-----	46
References-----	47

## 1 前言

根据世界能源权威机构1999年底的分析,世界已探明的主要矿物燃料储量和开采量不容乐观:石油剩余可采年限仅有40年,其年消耗量占世界能源总消耗量的40%;天然气剩余可采年限为60年,其年消耗量占世界能源总消耗量的24%;煤炭剩余可采年限为230年,其年消耗量占世界能源总消耗量的25%;铀剩余可采年限为73年,其年消耗量占世界能源总消耗量的7.6%。按目前的消耗估算,人类不仅将面临严峻的能源危机, 同时还将面临过度使用矿物质能源而造成的生态环境危机<sup>[1]</sup>。

能源和环境问题是当今世界各国都面临的关系国家安全和经济社会可持续发展的中心议题,已经成为全球关注的焦点。因此,人们开始把目光转移到有利于社会可持续发展的可再生能源体系。专家认为,生物质资源转化体系是引领第三次世界能源革命的技术平台。在此背景下,燃料乙醇已经被视为替代和节约汽油的最佳燃料,其高效的转换技术和洁净利用日益受到全世界的重视,已经被广泛认为是21世纪发展循环经济的有效途径。

在中国,燃料乙醇的主要原料是玉米和小麦。随着燃料乙醇的快速发展,原料问题日益突出,成为制约燃料乙醇发展的瓶颈;另外,以粮食作物为原料的燃料乙醇产业发展还有可能引发国家粮食安全问题。因此,中国政府提出生物乙醇坚持非粮之路,即“不与人争粮,不与粮争地”。经济分析显示,中国发展纤维素乙醇有更大的优势。木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源,也是当前利用率最低的资源,是各国新资源战略的重点。中国可利用的木质纤维素每年在7亿吨左右,这些丰富而廉价的自然资源主要来源于农林业废弃物、工业废弃物和城市废弃物。所以,纤维素乙醇是未来发展的必然方向<sup>[2]</sup>。

木质纤维素包括纤维素、半纤维素、木质素。利用木质纤维素制燃料乙醇主要途径是先把木质纤维素中的纤维素和半纤维素部分降解为单糖,再利用酵母发酵单糖产燃料乙醇。木质纤维素降解为单糖的效率低是制约其工业化利用的因素。因此,筛选高效降解纤维素或半纤维素的菌株是解决问题的途径之一。本课题主要针对半纤维素的降解问题展开试验研究。

### 1.1 半纤维素

### 1.1.1 半纤维素的组成

半纤维素的来源广泛，是自然界中含量仅次于纤维素的可再生资源，大量存在于植物纤维中。我国的生物质资源极为丰富，每年仅农作物秸秆的产量达  $5.7 \times 10^8$  t，森林面积达 15800 多万公顷，森林蓄积量为  $1.1 \times 10^6$  多万立方米<sup>[3]</sup>。表 1-1 为几种原材料中半纤维素的含量<sup>[4]</sup>。

表 1-1 几种原材料的纤维素、半纤维素、木质素含量

Tab.1-1 The contents of cellulose, hemicellulose and lignin in some materials

原材料	木质素 (%)	纤维素 (%)	半纤维素 (%)
松木 (Pine wood)	27.8	44.0	26.0
桦木 (Birch wood)	19.5	40.0	39.0
甘蔗渣 (Bagasse)	18.9	33.4	30.0
稻草 (Rice straw)	12.5	32.1	24.0
棉花 (Cotton)	0	80~95	5~20

我国地处亚热带地区的南方诸省盛产甘蔗，蔗渣是糖厂大量的副产物，占甘蔗的 24%~27%。每年轧糖副产甘蔗渣近千万吨<sup>[5]</sup>。由于地理优势，本研究选择蔗渣为发酵底物。

半纤维素是植物细胞壁中除纤维素、木质素、果胶质、淀粉以外的一种重要多糖。存在于木质素和纤维素的下面，起着黏合剂的作用，把木质素和纤维素紧紧拉在一起，共同构成细胞壁的支持体系<sup>[6]</sup>。半纤维素不是一种均一的聚糖，而是混合聚糖的总称，组成半纤维素的结构单元（糖基）主要有：D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖基、D-半乳糖基、L-阿拉伯糖、4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸基、D-半乳糖醛酸基和 D-葡萄糖醛酸基等，还有少量的 L-岩藻糖基以及各种带有氧甲基、乙酰基的中性糖基。这些结构单元在构成半纤维素时，若是由一种结构单元构成一种均一的聚糖，成为同聚糖；而一般情况下是由 2-4 种结构单元构成的不均一的聚糖，聚合度（简称 DP，指多聚物中所含单体数）较低，一般不超过 200，常见是 80~120<sup>[7]</sup>。

### 1.1.2 木聚糖的结构

木聚糖属于半纤维素的一种，它是被子植物（阔叶木和禾本科）细胞壁中最

主要的半纤维素。禾本科植物的半纤维素主要是木聚糖类，在这类植物中，已发现了不同分子特性的木聚糖，如西班牙草中主要是只由木糖基构成的线状均一的木聚糖，热带草中主要是高分枝度的木聚糖，禾草类中主要是阿拉伯糖-4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖<sup>[8]</sup>。木聚糖结构如图 1-1。

Atkins 等<sup>[9]</sup>描述了木聚糖分子的三维结构，如图 1-2。在结晶条件下，木聚糖主链呈三重左手构象，配糖键几何学特征不受侧链影响。对该多糖研究结构表明，主链的约束程度最小化，侧链之间的相互作用决定了分子最终构象。电子衍射模式也证实了其三重构象，而侧链排成为带六边形的三角系点阵。木糖环上第 5 位单个氢对链间和链内氢键的相互作用具有显著影响。能量计算暗示 D-木糖环存在有共同的 4C1 椅式构象，这表明在 1-4 和 1-3 糖苷键连接的木聚糖中，其

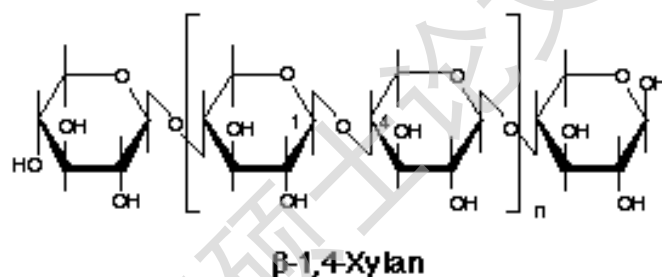


图 1-1 木聚糖结构

Fig.1-1 Structure of xylan

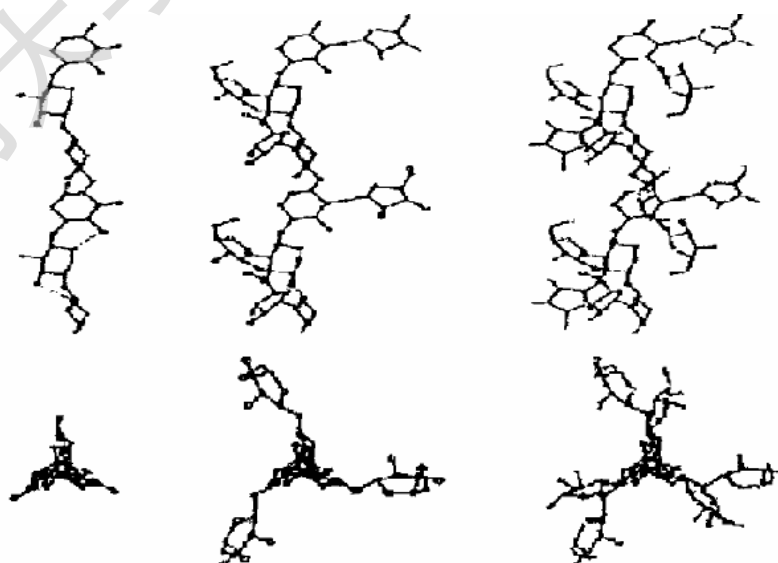


图 1-2 木聚糖的立体结构

Fig.1-2 Three-dimensional structure of xylan

键为双平伏键，链内氢键  $O(2')H \cdots O(6')$  加强  $O(3') \cdots O(5')$  间氢键有利于结构的双重伸展，即像带状的螺旋结构，以及  $O(6)H$  集团与邻近  $O(3)$  原子之间氢键形成折叠片。这些研究结果同时也得到了糖苷键几何学特征维持了木聚糖分子的基本构象。然而从水相环境中得到木聚糖三维结构数据可能对于了解木聚糖和木聚糖酶相互关系更为重要<sup>[9]</sup>。

### 1.1.3 木聚糖的提取

#### 1.1.3.1 木聚糖的提取方法

木聚糖的提取方法有碱提取法、高温蒸煮法、蒸汽喷爆法等<sup>[10]</sup>，具体方法如表 1-2。根据本论文的研究需要及实验设备选取碱提取法为基本提取途径，提取碱液选用 NaOH。

表 1-2 几种木聚糖提取方法比较

Tab.1-2 Comparison of several extracting methods of xylan

提取方法	主要原理	优缺点
碱提取法	利用半纤维素溶于碱溶液，不溶于其它溶剂的性质，先用碱溶液将半纤维素抽提出来，然后沉淀分离抽提物获得木聚糖。此方法适合于以木聚糖为主要成分的半纤维素原料。	优点是提取率较高、提取纯度高。缺点是对原材料预处理不够，未能充分破坏木聚糖同木素的结合使之充分溶出，处理后的碱液若不加处理或利用会对环境造成一定程度的污染。
高温蒸煮法	利用高温破坏木聚糖与纤维素、木素的结合，利用木聚糖自身含有的乙酰基在一定温度或压力的作用下脱落生成乙酸，造成体系的 pH 值降低，从而使木聚糖发生自身水解作用，木聚糖分子量降低、溶解度增大。	优点是处理量较大，提取率较高，但提取纯度不及碱提取法，并且蒸煮法需要较高的温度和压力，因此对设备要求较高。
蒸汽喷爆法	在一定压力、温度和水分条件下，半纤维素发生糖苷键断裂，释放出乙酸，即进行自身水解反应，变为分子量较小、可溶于水的木聚糖。	优点是处理量大，这一预处理技术在加拿大已应用于商业化生产，缺点是对设备的要求较高，能耗较大，在高温条件下由于部分木聚糖的变性会产生糠醛等有害物质。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库